

张彦 (收)

D3 (pages 4)

研究报告 REPORTS

- 3 蔡建平, 柯伟等. 中国腐蚀与防护学报, 1997, 17(4): 303-306
4 王轩义, 王光雍等. 腐蚀科学与防护技术, 1998, 10(3): 171-173
5 邓聚龙著. 灰色预测与决策. 武汉: 华中理工大学出版社, 1992. 105-108
6 罗逸, 李平等. 腐蚀科学与防护技术, 1997, 9(1): 1, 70-74

GREY RELATIONSHIP ANALYSIS FOR MAIN ENVIRONMENT FACTORS OF STEEL CORROSION IN SEA WATER

ZHU Xiang-rong¹ ZHANG Qi-fu²

(¹Center Iron and Steel Research Institute, Qingdao Research Institute for Marine Corrosion, 266071)

(²Center Iron and Steel Research Institute, Laboratory of Surface Technology and Corrosion Engineering, Beijing, 100081)

Received: Mar. 9, 1999

Key Words: Iron and Steel, Sea water corrosion, Grey relationship analysis, Environment factors

Abstract

The relationships between corrosion of steel and environment factors in sea water have been studied by grey relationship analysis methods. The main environment factors of localized corrosion depth of carbon steel and alloy steel and average corrosion rate in sea water have been found in accordance with grey relationship grade. The analysis conclusion are in line with the actual situation. Grey relationship analysis affords new idea and mathematics basis evaluation of sea water corrosivity. (本文编辑: 张培新)

鲨鱼软骨多糖的理化性质及其与 DNA 分子相互作用的研究*

李东霞¹ 李德良² 张双全¹

(¹南京师范大学生命科学学院 210097)

(²内蒙古中医院生化室, 呼和浩特 010020)

摘要 以鲨鱼软骨为原料, 用改进的提取工艺, 制得纯度较高的鲨鱼软骨多糖(SCAMP). 对其进行理化性质分析, 表明 SCAMP 含有 29.90% N-乙酰半乳糖胺、27.00% 葡萄糖醛酸、13.50% 硫酸根及 0.20% 蛋白质. 红外光谱测试表明 SCAMP 的糖残基可能是 α -糖苷键, 推测其主要成分是硫酸软骨素类多糖. 用荧光探针法证实 SCAMP 与 DNA 分子能相互作用, 并呈量效关系, 为进一步探索 SCAMP 抗癌作用机理提供了一项实验依据.

关键词 鲨鱼软骨, SCAMP, DNA, 荧光探针, 抗癌

自从 Langer 及 Lane 首先发现鲨鱼软骨中含有阻止肿瘤血管形成的物质, 其后有关鲨鱼软骨多糖(SCAMP)抗癌及其药理分析方面的研究越来越多, 并引起人们的关注. 1997 年, 沈先荣等发现鲨鱼软骨抗

肿瘤制剂(SCATP)使荷瘤小鼠血浆中 6-Keto-PGF_{1 α} 和

* 江苏省自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1999-09-05; 修回日期: 1999-12-29

TXB2的水平显著下降,而不改变两者之间的比值平衡;同时使Hela细胞骨架发生凝聚或固缩;并显著抑制实验动物肿瘤的生长^[1].1998年,吕家本、于志浩等证实鲨鱼软骨提取物(SCAE)对C57BL/6J小鼠的B16黑色素瘤经血道肺转移有明显的抑制作用;对S180肉瘤和Lewis肺癌小鼠的抑瘤率达到50%以上^[2,3].但上述研究均是以鲨鱼软骨粗提物为实验材料,为了阐明鲨鱼软骨中有效抗癌成分及其作用机制,作者在前人研究的基础上改进工艺技术,提取制备了SCAMP精品,对其进行了理化性质的测定,并应用荧光探针法研究了它与DNA的相互作用,初步探讨了SCAMP的抗癌作用机理.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 鲨鱼软骨由市场购买.

1.1.2 试剂 溴化乙锭、考马斯亮蓝G-250为瑞士Fluka公司产品;D-半乳糖醛酸为Sigma进口分装;DNA、N-乙酰葡萄糖胺、牛血清白蛋白(电泳纯)、碱性品红等试剂均为国产分析纯.

1.1.3 仪器 日本岛津RF-340荧光分光光度计;美国PE公司Lambda 17型紫外分光光度计;日本岛津IR-408红外光谱仪;美国Beckman Allegra 21R冷冻高速台式离心机.

1.2 方法

1.2.1 SCAMP的制备 鲨鱼软骨脱水、脱脂、粉碎,加6倍的6%NaOH溶液50℃抽提4h,调pH=7.0左右,沸水浴40min,1%胰蛋白酶40℃水解10h,然后用10%三氯乙酸去蛋白质,以3倍无水乙醇沉淀SCAMP,脱水干燥^[4].

1.2.2 SCAMP组分及含量测定 用改进的SorrMorgan反应鉴别氨基乙糖,用吡啶法和地衣酚法鉴别乙糖醛酸,用BaCl₂试剂鉴别硫酸根^[5].

1.2.3 光谱测试 (1)测试样品浓度配制成100 μg/ml,在190~300 nm波长范围内进行紫外扫描;(2)取测试样品1.5 mg与一定量溴化钾粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀,混合压片,选择波长4 000~650 cm⁻¹范围进行红外光谱扫描.

1.2.4 蛋白质含量测定 以牛血清白蛋白为标准,用G-250考马斯亮蓝染色法定量分析.显色液(称取考马斯亮蓝G-250 10 mg,溶于95%乙醇5 ml,再加入85% H₃PO₄ 10 ml混匀,用双蒸水定容至100

ml,滤纸过滤,4℃放置备用).配制300 μg/ml的标准蛋白溶液和1 mg/ml的SCAMP溶液.标准曲线制作和蛋白浓度测定参见文献[6].

1.2.5 SCAMP与DNA的相互作用 称取1 mg和2 mg SCAMP,分别溶于1 ml 10 mmol/L KNO₃母液(5 μg/ml EB+ 25 μg/ml DNA)中,为测试样品组;同时用10 mmol/L KNO₃溶液分别配制含5 μg EB, 5 μg EB+ 25 μg DNA作为两种溶液对照组,总体积为1 ml.上述溶液配好后,于4℃暗处静置一段时间,然后在狭缝为Ex=10 nm, Em=10 nm,激发波长为520 nm,扫描范围为500~750 nm,扫描速度中等的条件下进行荧光光谱扫描,方法参见文献[7].

2 结果

2.1 光谱分析

紫外光谱测试表明其在280 nm, 260 nm处均没有明显的光吸收,说明SCAMP样品中几乎不含有蛋白质和核酸,这和蛋白质含量分析结果一致,在200 nm处有糖的较强光吸收峰,见图1.

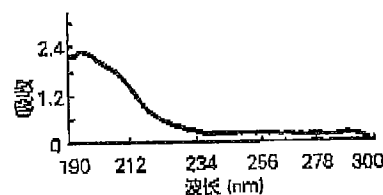


图1 SCAMP的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrogram of SCAMP

红外吸收光谱显示典型的硫酸粘多糖的吸收特征,与透明质酸有相似的吸收峰^[6],如表1、图2所示.SCAM在波数3 400 cm⁻¹处有强OH和NH的伸缩振动特征吸收峰;在1 400 cm⁻¹~1 320 cm⁻¹处有GO伸缩振动和OH弯曲振动耦合产生的两个吸收峰;说明存在糖醛酸上游羧基结构和多羟基基结构;在1 640 cm⁻¹, 1 560 cm⁻¹处有C=O和GN伸缩振动特征吸收峰,表明存在乙酰氨基结构.在930, 820 cm⁻¹和760 cm⁻¹处均有较弱的硫酸软骨素特征吸收,并且在850, 830 cm⁻¹处有吸收峰,而在900 cm⁻¹处无吸收峰,提示糖苷键为α-构型的可能性.

2.2 组分及含量测定

表 1 SCAMP 的红外光谱

Tab. 1 Infrared spectrum of SCAMP

波数(cm^{-1})	强度	功能基团
3 400	强	-NH, -OH
2 900	弱	C-H
1 730	中	C=O
1 640	中	C=O, NHCOCH ₃
1 560	中	C-N
1 460	较弱	C-O
1 375	中	S=O
1 310	较弱	O-H
1 240	强	-OSO ₃ , S=O
1 120	强	C-O
1 070	强	C-O-C
930	较弱	C-O-C
820	中	C-O-S

结果表明, SCAMP 含有 29.90% N-乙酰半乳糖胺、27.00% 葡萄糖醛酸、13.50% 硫酸根及 0.20% 蛋白质。其中蛋白质含量小于 0.5%, 低于瑞典 Healon 对蛋白质的最底限度要求, 可以进行注射液的制备, 如表 2。

表 2 SCAMP 的组分含量测定

Tab. 2 Constituent content determination of SCAMP

组分	含量($\times 10^{-3}$) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	百分含量(%)
氨基葡萄糖	29.90 \pm 20.3	29.90 \pm 2.03
葡萄糖醛酸	27.00 \pm 14.6	27.00 \pm 1.46
硫酸根	13.50 \pm 19.6	13.50 \pm 1.96
蛋白质	2 \pm 0.30	0.20 \pm 0.003

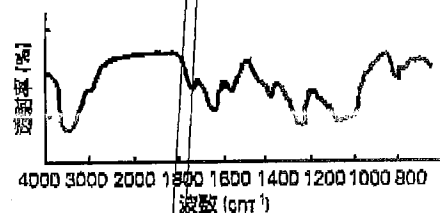


图 2 SCAMP 的红外光谱

Fig. 2 Infrared spectrum of SCAMP

2.3 SCAMP 与 DNA 的相互作用

图 3 显示: A 为单纯 EB 产生的荧光; B 为 EB 和 DNA 混合作用后, 其荧光光谱的荧光强度值最大, 当在 EB 和 DNA 的混合液中加入 SCAMP 后, 由于

SCAMP 与 DNA 能相互作用, 使荧光强度明显降低, 并呈量效关系, 即随着 SCAMP 量的增加, DNA 与 EB 结合后产生的荧光锐减。

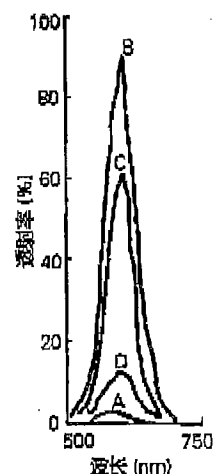


图 3 SCAMP 与 DNA 相互作用的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescent spectrum of interaction of SCAMP and DNA

A. EB; B. EB+DNA; C. EB+DNA+1 mg SCAMP;

D. EB+DNA+2 mg

3 讨论

目前, 有关鲨鱼软骨的研究很多, 但一般都以鲨鱼软骨粉或粗提取物为实验材料。作者在柴向华等人提出的工艺流程的基础上, 增加了热水抽提和三氯乙酸去蛋白得到了无蛋白的鲨鱼软骨多糖纯品(SCAMP)。该多糖为白色, 水溶性好, 得率为 12.46%。根据 SCAMP 的组分及百分含量测定, 以及紫外-红外光谱的分析, 推测 SCAMP 的主要成分为硫酸软骨素类多糖。

鲨鱼软骨的抗癌机理目前还不甚清楚, 就所掌握的资料认为这可能与软骨中所含大量粘多糖、胺基糖及丰富的活性蛋白, 主要包括血管生成抑制因子、肿瘤细胞抑制因子和抗肿瘤侵犯因子等的综合作用有关, 血管生成抑制因子可能通过两种方式抑制血管生成: 其一, 抑制遗传物质的合成, 影响染色体复制, 使细胞分裂受阻, 或者影响细胞代谢, 使其不能合成所需的蛋白水解酶, 从而抑制内皮芽的生长。其二, 通过抑制癌细胞骨架的形成, 或者使细胞骨架发生凝聚和固缩, 破坏其结构完整性, 抑制内皮